

大肠杆菌 现形记!

近几十年来,出现了一些危害人类健康,特别是儿童健康的新型致病微生物。由于体重较轻,免疫系统尚未发育完全,儿童更容易受到由弯曲杆菌(*Campylobacter*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、单核细胞增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*) O157:H7等引起的食源性疾病(经食物传播的疾病)的感染。在这场确定食物是否受到污染以及追踪污染的病菌来源的战役中,许多研究工作都是以大肠杆菌O157:H7为重点,因为它可引起若干种最严重的儿童食源性疾病,并已被认定为美国数次大规模疾病爆发的元凶。

随着有关大肠杆菌O157:H7危害性证据的增加,科研界也不断加大力度,寻求可以迅速检出这一病菌并进行定量的技术。研究发现只要有10个大肠杆菌O157:H7就足以致病,因此,高度敏感、能测出极少量细菌的细菌或者能够迅速将细菌数量扩增到可以检出的水平,是理想的检测方法必须具备的特性。目前大多数的临床检测方法都要至少培养8小时,才能检测。所谓培养,就是将样本置于富含营养的培养基或环境中,使少量细菌繁殖至可以检出的数量。目前康奈尔大学和农业农业部(USDA)研究人员各自都在努力应用现有分子技术,提高检测速度和敏感度,开发出一串使用方便且价格低廉的现场筛查装置。

长期存在,记载不多

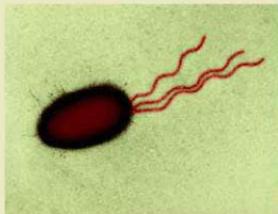
正常情况下,大肠杆菌是存在于各种动物,包括人类的肠道内。大肠杆菌是肌体内的一种有益菌,它可以抑制有害细菌的生长,并合成维生素。美国疾病预防和控制中心(CDC)1976年发现了血清型为O157:H7的埃希氏大肠杆菌亚群,但是,直到1982年才作出它与肠道疾病相关的结论。世界各地都曾有过大肠杆菌O157:H7相关疾病爆发的记录。

1993年,Jack In The Box快餐连锁店出售未煮熟的污染汉堡引起700多人(以儿童为主)食物中毒,并造成4人死亡。这一事件使大肠杆菌O157:H7臭名远扬。此后,卫生官员、食品工业和消费者对碎牛肉的安全性不再等闲视之。例如,2001年夏天,在大肠杆菌O157:H7爆发殃及36人之后,ConAgra Foods立刻召回了怀疑受到污染的1900万磅碎牛肉。美国疾病预防和控制中心估计,美国每年因大肠杆菌O157:H7致病总人数大约为73000人,尽管上板的病例已有所下降。

大肠杆菌O157:H7主要来自牛羊的胃肠道。部分细菌是通过牛粪污染农田灌溉用水,另一部分细菌是通过在食物加工过程中因操作不当污染肉类制品而传递给人类的。大肠杆菌O157:H7的爆发或爆发主要由饮用水、自助餐、萨拉米香肠、酸奶、苹果酱或果汁带菌引起。后者可能是因为掉到地上的苹果接触粪便后被污染

的。另外,儿童在受到污染的水中游泳也会被感染。1998年,在佐治亚州亚特兰大水上公园发生的大肠杆菌O157:H7大爆发使得多名儿童住院。

尽管许多食源性疾病都是急性的,但往往也会持续一段较短的时间,久治不愈的情况少之又少。大肠杆菌O157:H7的潜伏期一般为3-5天。该病菌产生的毒素会引起腹部痉挛、呕吐和便秘,有时伴有发热。在有些急性发作病例中,感染会进一步发展成溶血性尿毒症(HUS),表现为红细胞



破坏、肾脏衰竭,并可引发癫痫、中风,严重时会引起死亡。在老年人中,HUS并发高烧及伴有其他症状时,会引起与HUS类似的血栓形成性血小板减少性紫癜,其死亡率高达50%。

4-5岁以下儿童受大肠杆菌O157:H7感染的风险相对较高。大肠杆菌O157:H7可能是造成幼儿及婴儿急性肾衰竭以及

HUS最主要的原因。根据美国疾病预防控制中心提供的资料，婴儿的大肠杆菌 O157:H7 感染率是 6.1/100000，1-9 岁儿童的感染率是 8.2/100000。这一感染率是所有年龄组中最高的。

微观方法解决重大问题

康奈尔大学食品研究实验室的 chemistry 教授 Richard Durst 已经开始研究一种方法，利用脂质体将标志物传送到食物样本中，使存在的大肠杆菌 O157:H7 和其他病菌现形。脂质体是由两层磷脂/胆固醇外壳组成的纳米级球体，里面可包埋从荧光染色剂到电活化成分的各种不同标志物。由于脂质体外壳由化学反应性元素构成，因此，可以结合多种表面标志，包括抗体、抗原、寡核苷酸探针和细胞受体。

Durst 说：“由于能选择不同的附加物或包埋物，因此，我们可以开发应用各种形式的脂质体。我们已经研制出来方法包括类似于家用验孕棒、以光学为基础的层析系统 (lateral-flow systems)、荧光检测装置和微流体检测装置。只要有抗体、基因探针、或受体蛋白，就可以利用这一脂质体技术制作生物分析传感器。

在简单的试纸检测中，抗体附着在脂质体外壳表面上，与样本混合后，就可结合样本中的大肠杆菌 O157:H7。脂质体内包含的显色分子会将病菌清晰地标出来——将样本滴在试纸条上时，如果样本液体中含有大肠杆菌 O157:H7，试纸就会变红。然后，再根据试纸颜色深浅判断病菌数量的多寡：颜色越深，细菌越多。

微型盒式检测装置可以在 10 分钟以内检出存在数量较多的大肠杆菌 O157:H7，但检测单个病菌则需要几个小时。已有技术也可以很快检定这一细菌的存在，但需要经过 8 小时的培养，将细菌数量放大到 105 或 106 后，才可检出。“由于每个胞体内都包含了成千上万甚至上百万个标志物分子，因此存在很大的放大效果。”Durst 说。“因为利用脂质体标签进行检测和信号放大不需要经过二次反应——传统酶学检测需要进行二次反应——利用脂质体几

可以立即测得病菌的存在。”

已经有人研究过将该项技术用于检测战用化学和生物毒剂、天然病菌 (如小噬孢子虫)、病毒 (如麻疹病毒) 以及天然毒素 (如肉毒毒素)。该装置的独立现场试验由纽约州能源研究和发展机构提供资助，目前正由一个郡的公共卫生实验室具体开展。

曾在 Durst 门下攻读博士后，现为康奈尔大学生物和环境工程系助理教授的 Antje Baemmer 目前正在研究一种补充性检测技术。该技术将脂质体和以微流体技术为基础的生物技术结合在一起使用。微流体技术采用了可以处理极少量液体 (通常是纳升级) 的装置和工艺。在这一微量测定系统中，液体通过孔道的毛细运动特性发生变



速着了! 用脂质体免疫检测装置检测大肠杆菌 (左); 根据检测结果, 试纸显示阳性或阴性 (右)。

化。因此, 利用很细小的孔道, 可以用新的方法对液体进行控制并加以利用。Baemmer 的目的是为了研制出一个微型全量分析系统 (μ -TAS), 这是一个可执行样本制备、放大、电化学检测和病菌定量等全部步骤的自动化微孔道“芯片实验室”——整个装置如同掌上电脑般大小。 μ -TAS 的其中一个芯片由电活化偶 (同一分子的氧化和还原形态) 的脂质体构成, 用这一分子取代可见标志物来检测大肠杆菌 O157:H7 等病菌的存在。在芯片上的一个腔室内, 用极细的纳米级铂电极和阴极板不断对电活化偶进行氧化和还原。这一氧化还原反应不断交替进行, 所产生的电子就会流过微电极, 并可轻易测得。电流信号强度与大肠杆菌 O157:H7 的浓度成正比关系。

几家大学和政府研究机构正在对 Durst 和 Baemmer 研制的技术进行评估。许可证协议、现场试验以及此项技术未来的商业化则

通过创新生物技术国际公司 (Innovative Biotechnologies International) 办理。该公司总裁 Richard Montagna 说, 商业化的小噬孢子虫 (*C. parvum*) 生物检测器于 2003 年初问世, 大肠杆菌 O157:H7 生物传感器大约还需要等一年。

未来的检测器是什么样的?

其他检测大肠杆菌 O157:H7 的技术还处于早期开发阶段。例如, 位于马里兰州贝兹维尔市的美国农业部动物排泄物病原菌研究实验室微生物学家 Daniel Shelton 正在研究一种快速定量及确定自然水体和人工水体中存在的大肠杆菌 O157:H7 的方法。

Shelton 的方法是将大肠杆菌 O157:H7 的单克隆抗体吸附到磁颗粒上, 使其与病菌结合。他未透露具体使用的是哪一种培养基, 但是, 他说这种方法可以很快将病菌培养到可以检出的水平——在一天之内甚至更短——传统的水质检测则需要 4 天。这种万法可以检出 100 毫升水中含有的 1 个大肠杆菌 O157:H7, 这一方法有助于卫生机构对公共水上场所进行检查, 如游泳池。

Shelton 说磁颗粒技术并不是新事物——多种商业化的免疫检测装置就是利用磁颗粒传递化学标志物完成检测的。但是, Shelton 的方法的独特之处在于一个快字——可迅速对样本中所含的大肠杆菌 O157:H7 定量。而且, 其他研究工作都是以检测病菌污染为重点的, 而不是水。Shelton 的研究成果还没有公开发表, 他仍在等待最新研究的结果。但公共供水部门和水质专家已对他的技术表现出极大的兴趣。

然而, 在乔治亚大学食品安全中心主任、食品微生物学教授 Michael Doyle 说, 只有这些方法的有效性经过时间的验证后, 人们才会接受。他本人也在从事此方面的研究工作。Doyle 指出, 开发任何一种快速检测万法时都会遇到, 而又往往被忽视的一个最大障碍是: 任何样本中, 大部分大肠杆菌 O157:H7 都会因加热、冷却或氧化消毒等遭到了破坏。

Doyle 说, 唯一能够保证不漏过一个大肠杆菌 O157:H7 的方法是给它们足够的培养时间, 使它们复苏, 就如同这些病菌进入人体后的复苏一样。但对此他表示同意, 但又补充说, 他的方法是以对少量微生物的高度敏感性为基础的, 因此, 导

然不能将大肠杆菌 O157:H7 精确定量,但却可以迅速确定其存在,即使大量细菌都处于休眠状态。他说:“我们的酶活性免疫分析装置的不培养检出极限是 1000 个目标细菌每毫升或每克。大多数基于免疫的检测都要求每毫升或每克中所含的目标细菌至少达到 10000-100000 个。所以,由于检测灵敏度提高了 10-100 倍,我们只需要大约 3 小时,就可以实现每毫升或每克中目标细菌少于一个的检测。”

食品工业有意利用这些技术并高度赞扬了他们所开发的同时适用于食物和水的检测方法,但需要进行的工作还很多。华盛顿特区一家行业协会——美国食品加工协会食品安全高级主管 Jenny Scott 说,检验旨在消除大肠杆菌 O157:H7 威胁的整个工作的一部分。“任何检测方法都有其局限性。”她说,“不管这种方法有多好,也难以尽善尽美。”

Scott 说,从农场到厨房,整个食物链都应强调卫生的重要性。应向消费者加大宣传力度,将食物煮熟,彻底杀死食物中的细菌,并理解食物辐射消毒的重要性。其他一些关键措施包括在食品加工过程中妥善处理食品并进行检测。从一开始就注重采用最佳的农业实践和农业科学,如妥善处理粪便,甚至研制牛的大肠杆菌 O157:H7 疫苗。

—W. Conard Holton

译自 EHP 110:A586-A589 (2002)

推荐读物

Buzby JC. 2001. Children and microbial foodborne illness. FoodReview 24(2):32-37.

Peng P. 1996. Escherichia coli serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. Emerg Infect Dis 1(2):47-52.

IPT. 2000. Emerging Microbiological Food Safety Issues: Implications for Control in the 21st Century. Chicago, IL: Institute of Food Technologists.

Park S, Worobis RW, Durst RA. 1999. Escherichia coli O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review. Crit Rev Food Sci Nutr 29(6):481-502.

腹泻的困扰

——墨西哥的疾病管理

尽管防止水源污染是很重要的,但是,墨西哥公共卫生研究所 (Instituto Nacional de Salud Pública) 的一份研究报告指出,水在供应途中的管理似乎更加重要。[EHP 110:A619-A624]。世界卫生组织称,因生活污水处理不当和病原体的经口入侵,每年都有 320 万名未成年人死于完全可以避免的肠道疾病,其中包括腹泻性疾病。但是 Enrique Cifuentes 等人却认为,微生物数量等水质指标并不一定能准确反映健康风险。相反,要想有效控制肠道疾病,还应考虑住房不足、个人卫生习惯、储水方式以及风险意识等因素。

此项研究重点考察了墨西哥郊区使用再生水的 Xochimilco 社区,对一系列可能与肠道疾病有关联的因素进行了分析。研究人员收集了儿童的父母或监护人所提供的数据对 5 岁以下儿童进行评价:雨季 (1999 年 11 月-2000 年 5 月) 761 人,旱季 (2000 年 6-10 月) 732 人,样本重叠比例 75%。

腹泻在雨季的患病率为 11.8%,旱季为 10.7%。在旱季,1-2 岁之间的儿童最容易患病,但如果蔬菜只用水,或用水和肥皂清洗而不用氯消毒,饮用水储存在未加遮盖的水池或水桶中,水有异味或儿童居住条件拥挤,各年龄段的儿童都容易受到感染。

相反,如果家庭有冲水马桶的厕所,饮用水储存在有遮盖的坛子、水池、或水桶中;可以在家淋浴;自来水 24 小时供应 (大约有 35% 的家庭) 而不是定时供水的话,这些人最不容易受到感染。

雨季表现出的唯一的年龄特征就是 2 岁以上的儿童比较容易患腹泻性疾病,这与旱季一样。各年龄段的儿童如果食用路边摊贩的食物或饮用已经变色的水后,均容易受感染。



每一个因素都只是问题的一部分。住房不足、个人卫生习惯、储水方式以及风险意识等因素都能够影响到儿童是否会患上腹泻性疾病。

研究人员还发现,文化信仰对发病率也起着重要作用。生活在相信腹泻是因被鬼眼看到后引起的家庭的儿童的风险比那些认为腹泻是因不注意卫生或饮食污染引起的家庭的儿童要高。

此次研究是以居住在 5 口水井 500 米以内的家庭为调查对象。研究人员对水井进行了抽样,以检测其是否受到粪便大肠菌污染。结果发现,发病率与使用两口受污染的井水之间并无相关性。所调查地区废水利用项目十分普遍——主要是将污水处理后用来灌溉庄稼,这一做法极有可能使污染物进入供水系统。

此次调查研究的结果与世界其它地区所开展的类似调查结果一致,但调查设计存在几个方面的局限性。例如,生活、住房、水源等数据都是受调查人员自述的;水污染状况数据是以氯消毒和运达之前采集的样本为基础的,不能代表儿童饮用水的实际质量,尤其是有大约 20%-25% 的调查对象(雨季而定)喝瓶装水;此次研究还假定儿童们不取自研究区域以外的井水。尽管具有以上局限性, Cifuentes 认为,此次研究为将来评估水再生项目提供了很好的基线数据。

—Bob Weinhold

译自 EHP 110:A590 (2002)